Method: ICR male mice of 18 day-old were used. Testes were decapsulated and seminiferous tubules were dissociated enzymatically to release both somatic and germ cells. Collagen matrices were prepared from insoluble type collagen fiber which was extracted from rat tail by tendons by dissolving in 1/5000 acetic acid solution. For the collagen gel matrices and matrigel added collagen matrices, dissociated cells were incorporated into collagen matrices on culture dish containing concentrated culture media and then cultured for up to 18 day in modified RPMI 1640 medium at 32℃ with 5% CO_2 in air. For the monolayer culture as control, a group of dissociated cells were seeded into petri dish containing the same medium. After culture, cells were smeared onto L-lysine coated microscope slides and examined for the presence of transitionprotein-2 (TP-2) known to be specific for the round spermatid using anti-goat rabbit transition protein (TP2) antibody.

Results: After the few days of incubation, Collagen gel matrices were contracted and firm testicular cell complex were formed. Based on immunocytochemistry, a haploid population of cells appeared in vitro that was not in 18-day-old mice testis. Viability of the cells cultured by monolayer method or in a collagen gel matrix was 55%, 75% respectively. Collagen gel matrix culture method was observation indicated that 75% of the TP2 antibody stained cells developed from seeding cells. And matrigel added collagen gel matrix was showed 85% of the TP2 antibody stained cells from seeding cells. In contrast, Monolayer culture method showed that only 20% of cultured germ cells developed to round spermatids.

Conclusions: The novel culture system developed in this study is promoting diffsrentiation of gonocytes to presumptive spermatids in vitro based on the expression of spermatid-specific protein. A culture system consisting of a collagen gel matrix could support the in vitro differentiation of mouse male germ cells. Compared to the conventional monolayer culture method, the system appeared to be superior.

O-14 수컷 생쥐 생식줄기세포의 분리 및 증식과 체외배양을 통한 반수체 생식세포의 생산

포천 중문의과대학교 세포유전자 치료연구소[1], 차병원 여성의학연구소[2]

김계성 · 김수경[1] · 차광렬[2] · 양윤희[2] · 임정진[2] · 윤태기[2]
조정현[2] · 정태규[2] · 김현주[2] · 이동률[2]

Background & Objectives: 정자형성과정은 고환의 세정관내에서 생식줄기세포 (male germ-line stem cells, GSCs)의 분열과 분화를 통하여 성숙된 정자를 생산하는 일련의 과정이다. 생식줄기세포의 체외배양을 통한 증식과 분화는 남성불임의 원인을 찾고 남성생식능력의 생물학적 기초를 제공하는데 매우 효율적인 접근방법이라 할 수 있다. 본 연구의 목적은 분리 후 동정과 증식을 한 생식줄기세포의 배양조건의 확립과 반수체 생식세포로의 분화를 유도하는데 있다.

Method: 실험재료는 3~5일령의 ICR 수컷 생쥐를 사용하였으며, 생쥐의 생식줄기세포를 분리한 후 배양하여 multi-cellular colonies를 형성시키고 5회에 걸쳐 계대배양을 하였다. 이후 multi-cellular colonies의 일부는 alkaline phosphatase activity, surface marker expression (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4), immunocytochemistry (integrin β1, α6)와 in situ hybridization (Oct-4 mRNA probe)를 위하여 고정하였으며, 나머지

는 calcium alginate을 이용하여 capsul형태로 만들어 6주간 체외배양 하였다. 6주간 배양 후 역전사중합효소반응 (Oct-4, c-kit, TH2B, TP-1 gene)과 면역조직화학법 (anti-c-kit, peanut agglutinin)을 이용하여 발현정도와 발현부위를 관찰하였다.

Results: 고환의 세포들을 5회의 계대배양을 한 후 alkaline phosphatase 활성화 반응과 줄기세포의 표지유전자인 Oct-4 mRNA의 발현이 colonies내의 세포들에서 높게 나타났으며, 또한 줄기세포의 표지인자인 (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4)와 면역학적표지인자 (integrin β1, α6)에서도 양성반응을 나타내었다. Re-encapsulation한 세포를 6주 동안 체외에서 배양한 결과 re-encapsulation한 세포내의 Oct-4 mRNA의 발현은 감소한 반면 정모세포 (spermatocyte)의 표지유전자와 단백질인 c-kit, TH2B mRNA와 peanut agglutinin은 증가하는 양상을 나타내었다. 정자세포의 표지유전자인 TP-1 mRNA의 발현은 3주전 까지는 나타나지 않았으나 그 이후부터 6주 배양군에서 나타났다.

Conclusions: 이상의 결과를 종합하면, 미성숙 생쥐의 고환으로부터 얻은 생식줄기세포가 본 연구의 체외배양조건 하에서 생식줄기세포로 증식, 유지됨을 알 수 있었다. 또한 이러한 생식줄기세포는 장기간 배양을 통하여 반수체의 생식세포로 분화할 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 보았다.

본 연구는 21세기 프론티어 연구개발사업 세포응용연구사업단 (SC12011) 및 과학재단 특정기초 (RO1-2001-000-00144-0) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

O-15 혼합가스와 GIII Series배양액을 이용한 인간배아 체외배양시스템의 임상적 결과

한나여성의원

지희준 · 김강식 · 구정진 · 한세열 · 이주옥 · 장상식

Background & Objectives: 인간배아의 체외배양시스템은 지난 10여년 동안 배아의 대사과정에 기초한 체외배양액의 개발로 배양액 단독으로도 배반포까지의 체외발달이 가능할 정도로 눈부신 발전을 이룩하였다. 따라서 체외배양시스템의 개선을 위한 앞으로의 연구는 활성화산소 (ROS, reactive oxygen species), 온도변화, 또는 공기오염 등 보다 기초적인 조건들을 최적화 시키기 위해 수행되어야 할 것이다. 이에 본 연구는 기본적인 단계의 연구로서 상용화된 체외배양액 (GIII Series)의 사용과 함께 활성화산소의 해로운 효과를 감소시킬 수 있는 혼합가스 (6% CO_2, 4% O_2, 90% N_2)를 사용하였을 때 나타난 임상적 결과를 보고하고자 한다.

Method: 본 연구는 2002년 2월 1일부터 2003년 9월 30일까지 365명의 환자에게 수행된 436예의 시험관아기시술을 대상으로 하였다. 사용된 체외배양액은 Vitrolife사의 G1, G2 배양액과 GIII Series 배양액을 사용하였으며 CO_2 단독가스 대신에 혼합가스를 사용하였다. 또한 modular incubator chamber를 사용함으로써 혼합가스 사용의 효율성과 경제성을 높이고자 하였다. 이들 436예의 시술을 사용한 배양액과 chamber 수에 따라 각각의 실험군으로 구별하였고 이들 군간의 임상적 결과를 비교하였다. 한편 배아이식 날짜에 따라 임상결과를 비교하였으며 배아이식용 배양액인 embryo glue를 사용한 군의 임상결과를 조사하였다. 그리고 환자의 나이 (40세 이상), 자궁내막 두께 (7 mm 이하), 수정에 사용된 난자의 수 (3개 이하) 그리고 배아의 질 (G1, G2, G3 이하) 등이 임신율에 미치는 효과를 비교